

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA



**Influência do volume da irrigação ultra-sónica passiva no efeito bactericida
do Hipoclorito de Sódio a 5,25% contra a *Enterococcus faecalis* – estudo *in vitro***

Susana Cristina Machado Lopes Furão

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

2011

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA



**Influência do volume da irrigação ultra-sónica passiva no efeito bactericida
do Hipoclorito de Sódio a 5,25% contra a *Enterococcus faecalis* – estudo *in vitro***

Susana Cristina Machado Lopes Furão

Dissertação orientada pela

Mestre Cláudia Cavaco Martins

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

2011

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Doutora Cláudia Cavaco Martins, pelos conhecimentos transmitidos e experiência científica fornecida até ao último minuto.

Ao Professor António Ginjeira, por ter permitido a realização deste projecto, por acreditar que ia ser possível, pelo voto de confiança e pela boa disposição, mesmo nas piores alturas.

Às incansáveis Professora Marise Almeida, pelo esforço, apoio, dedicação, disponibilidade, e Professora Iva Martins, pela ajuda laboratorial, presença e boa disposição, pois sem ambas não teria sido possível realizar este estudo.

À Doutora Sandra Pires, que me ensinou a gostar de Endodontia e, indirectamente, influenciou o tema do trabalho.

Aos meus pais, irmã e avó, por acreditarem em mim, pois sem eles nada seria possível.

Ao Marco, pela sua constante presença, paciência, preocupação, carinho e atenção, que permitiram ultrapassar os momentos mais difíceis deste trabalho.

Às minhas companheiras de laboratório e amizade, Patrícia e Bruna, sem elas o trabalho não teria sentido.

À Maria Joana, Daniela e Diana pelo apoio, sorrisos, preocupação e amizade, essenciais para levar o estudo até ao fim.

RESUMO

Introdução: A irrigação é um procedimento essencial para reduzir a carga bacteriana do sistema de canais radiculares infectados, para além de eliminar detritos orgânicos e inorgânicos das zonas de difícil acesso durante o tratamento endodôntico, o que influencia o seu sucesso a longo prazo. Várias são as variáveis que parecem aumentar a eficácia do irrigante, nomeadamente o volume utilizado. Assim, este estudo tem o objectivo de verificar se o aumento do volume de irrigante durante a lavagem final aumenta a eficácia bactericida de uma solução de NaOCl a 5,25%, contra a *Enterococcus faecalis*.

Materiais e Métodos: Quarenta e seis dentes unirradiculares humanos foram devidamente preparados com instrumentos rotativos de níquel-titânio. Foram divididos em dois grupos experimentais (20 dentes por grupo) e em dois grupos de controlo, um positivo e um negativo, com 3 dentes cada. Inocularam-se todos os dentes dos grupos experimentais e controlo positivo com uma suspensão bacteriana de *Enterococcus faecalis* e, posteriormente a tal, estes foram incubados em estufa, a 37°C e em atmosfera húmida, durante 48 h. Após este período, realizaram-se os procedimentos de desinfecção experimental. Grupo 1: irrigação com activação ultra-sónica com 2,5 mL de NaOCl a 5,25%; Grupo 2: irrigação com activação ultra-sónica com 5 mL de NaOCl a 5,25%. Foi realizada uma colheita de amostras do interior dos canais que foram colocadas em meio de cultura. Após 72 h, o crescimento bacteriano foi observado pela turvação deste meio.

Resultados: Todos os tubos referentes ao controlo negativo encontravam-se com crescimento bacteriano, logo os resultados obtidos não podem ser validados. Contudo, observaram-se 13 tubos sem crescimento no grupo 1 e 17 sem crescimento no grupo 2.

Conclusão: A eficácia bactericida destes procedimentos não pode ser aferida, uma vez que os resultados não se encontram validados, por uma possível contaminação microbiológica diferente de *Enterococcus faecalis*.

Palavras-Chave: Irrigação Ultra-Sónica Passiva; Agitação; *Enterococcus faecalis*; Hipoclorito de Sódio; Volume.

ABSTRACT

Introduction: Irrigation is an essential procedure to reduce the bacterial load of the infected root canal system, as well as reducing organic and inorganic debris from inaccessible areas during the endodontic treatment, which influences its long-term success. There are several variables that appear to increase the effectiveness of an irrigating solution, one of them being the volume used. Thus, the purpose of this study is to verify if, during the final irrigation, the increase of volume of a 5,25% NaOCl solution, increases the bactericidal efficacy against *Enterococcus faecalis*.

Materials and Methods: Forty-six single-rooted human teeth were duly prepared with rotary nickel-titanium files. They were then divided into two experimental groups (20 per each) and in two control groups, being one positive and the other negative, with 3 teeth each. The two experimental and the positive control groups were then inoculated with a bacterial suspension of *Enterococcus faecalis* and afterwards incubated in an oven at 37°C in a humidified atmosphere for 48 h.

After that time, the experimental disinfection procedures were carried out. Group 1: ultrasonic activated irrigation of 2,5 mL of a 5,25% NaOCl solution; Group 2: ultrasonic activated irrigation of 5 mL of the same solution. Samples from the root canals were collected, and bacterial growth was analyzed by turbidity of the culture midst after 72 h.

Results: All the negative control tubes presented a bacterial growth result and therefore the study cannot be validated. Nevertheless, we observed 13 test tubes with no growth in group 1 and 17 in group 2.

Conclusion: The bactericidal efficacy of these procedures cannot be verified due to a possible contamination of the midst by some other agent than *Enterococcus faecalis*, not enabling us to validate the results.

Keywords: Passive Ultrasonic Irrigation; Agitation; *Enterococcus faecalis*; Sodium Hypochlorite; Volume.

ÍNDICE

OBJECTIVOS	1
INTRODUÇÃO.....	2
HIPÓTESES	7
MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
RESULTADOS	12
DISCUSSÃO	13
CONCLUSÃO.....	19
BIBLIOGRAFIA	20
ANEXOS	25

LISTAS DE ABREVIATURA

- BHIB** – Brain Heart Infusion-Broth
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
E. faecalis – *Enterococcus faecalis*
MTA – Agregado Trióxido Mineral
Ni-Ti – Níquel-Titânio
PUI – Irrigação ultra-sónica passiva
UFC – Unidades formadoras de colónias
UI – Instrumentação ultra-sónica

OBJECTIVOS

Objectivo principal

Observar se numa irrigação final activada com ultra-sons, 5 mL de uma solução de NaOCl a 5,25% tem uma capacidade bactericida superior relativamente à irrigação com um volume de 2,5 mL da mesma solução.

Objectivos secundários

a) Avaliar a eficácia bactericida, em raízes de dentes infectados com *E. faecalis*, de uma irrigação final, activada com ultra-sons, de 5 mL de uma solução de NaOCl a 5,25%.

b) Avaliar a eficácia bactericida, em raízes de dentes infectados com *E. faecalis*, de uma irrigação final, activada com ultra-sons, de 2,5 mL de uma solução de NaOCl a 5,25%.

c) Comparar a eficácia bactericida dos procedimentos anteriores.

INTRODUÇÃO

O sucesso do tratamento endodôntico depende não só de uma correcta instrumentação e preparação do canal radicular, mas também da total eliminação de todos os microrganismos existentes no sistema canalar (Gutarts *et al.*, 2005).

Dada a elevada complexidade anatómica dos canais radiculares, nomeadamente deltas apicais, istmos, canais laterais, torna-se difícil a total eliminação de bactérias e dos seus produtos bacterianos, tecido vivo ou necrótico e restos de dentina resultantes da preparação do canal (Gutarts *et al.*, 2005; Munley e Goodell, 2007; Gu *et al.*, 2009). As características anatómicas acima referidas acabam por servir como depósitos destes produtos, o que pode conduzir a uma inflamação perirradicular persistente (Gu *et al.*, 2009).

Associado a insucessos do tratamento endodôntico encontra-se, na grande maioria dos casos um coco Gram +, *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) (Kayaoglu e Ørstavik, 2004; Stuart *et al.*, 2006). O *E. faecalis* é um coco anaeróbio facultativo e pode ser encontrado isoladamente ou em biofilme, conseguindo também sobreviver sem o suporte de qualquer outro tipo de bactérias (Kayaoglu e Ørstavik, 2004). Dentro dos factores que contribuem para a sua resistência, existem factores que permitem a invasão e ligação aos túbulos dentinários, como a gelatinase e as proteínas de ligação ao colagénio, e factores que permitem a sua sobrevivência em ambientes alcalinos, tal como a existência de uma bomba de protões (Kayaoglu e Ørstavik, 2004; Stuart *et al.*, 2006).

Para se conseguir eliminar toda a flora bacteriana existente no complexo canalar, é necessária uma acção mecânica, quando se procede à instrumentação do canal em todo o seu comprimento, e uma acção química, quando se procede à irrigação (de Gregorio *et al.*, 2009; Gu *et al.*, 2009; Miller e Baumgartner, 2010).

O irrigante desempenha também uma função químico-mecânica. A sua função química permite dissolver todo o tecido orgânico e inorgânico existente no canal radicular, bem como eliminar as bactérias num largo espectro de acção. Mecanicamente, o irrigante cria um fluxo de líquido de apical para coronal que transporta para fora do sistema canalar os produtos resultantes da instrumentação (Siqueira *et al.*, 2000; Zehnder, 2006; Borin *et al.*, 2007).

O hipoclorito de sódio (NaOCl) devido aos seus efeitos, nomeadamente a capacidade de dissolver matéria orgânica, lubrificação e capacidade bactericida, tem

sido o principal líquido irrigante utilizado na prática de endodontia (Estrela *et al.*, 2002; Tasdemir *et al.*, 2008; Valera *et al.*, 2009). Apesar destas capacidades antimicrobianas, quando em contacto com os tecidos perirradiculares é extremamente tóxico e, em casos de extrusão, pode causar edema, hemorragia e sintomatologia dolorosa aguda (Giardino *et al.*, 2009).

Pensa-se que um dos mecanismos de acção do NaOCl está relacionado com a presença de ácido hipocloroso (HOCl), presente numa solução de NaOCl (Estrela *et al.*, 2002). Este ácido, uma vez em contacto com a matéria orgânica, age como um solvente e liberta cloro. O cloro libertado vai-se ligar aos grupos amina (NH) das proteínas bacterianas, formando cloroaminas, produtos que interferem negativamente no metabolismo bacteriano (Siqueira *et al.*, 1997; Estrela *et al.*, 2002).

A alcalinidade de uma solução de NaOCl vai inibir irreversivelmente enzimas que mantêm a estabilidade da membrana. Assim, não só a integridade da membrana, mas também o metabolismo celular são afectados, culminando na lise bacteriana (Estrela *et al.*, 2002).

Vários factores parecem aumentar a eficácia da irrigação com NaOCl, factores que podem estar relacionados com o irrigante propriamente dito – concentração, volume, pH e temperatura (Kahn *et al.*, 1995; Nadalin *et al.*, 2009), e factores que podem estar relacionados com a técnica de irrigação – calibre da agulha, proximidade da agulha ao ápex e agitação da solução irrigante (Kahn *et al.*, 1995; de Gregorio *et al.*, 2009; Gu *et al.*, 2009; Nadalin *et al.*, 2009).

No que diz respeito ao volume de irrigante que deve ser utilizado, pouca evidência está disponível, contudo há estudos que preconizam a utilização de volumes maiores de irrigante, apesar de não ser um dado consensual (Kahn *et al.*, 1995; Sedgley *et al.*, 2004; van der Sluis *et al.*, 2006). Dada a função mecânica do fluxo de irrigante de apical para coronal, pode ser necessário mais volume de solução irrigante para que esta função seja desempenhada de uma forma eficaz (Kahn *et al.*, 1995; Siqueira *et al.*, 2000).

Existem várias técnicas que permitem agitar a solução irrigante, nomeadamente técnicas manuais e técnicas mecanicamente assistidas. Dentro das técnicas mecanicamente assistidas, existe a técnica de irrigação ultra-sónica (Gu *et al.*, 2009).

Os ultra-sons foram inicialmente introduzidos na endodontia por Richman em 1957. Contudo, somente com Martin em 1980, ficou demonstrada a sua capacidade de activar limas K, permitindo que, a partir deste momento, os ultra-sons fossem utilizados

na preparação canalar (Kahn *et al.*, 1995; Plotino *et al.*, 2007; van der Sluis *et al.*, 2007; de Gregorio *et al.*, 2009).

Os ultra-sons em endodontia podem ter várias aplicações, dentro das quais: facilitar o acesso aos canais que possam estar calcificados, remoção de obstruções canulares (instrumentos fracturados ou espigões intra-radiculares), condensação de alguns materiais de obturação como o agregado trióxido mineral (MTA), cirurgia endodôntica, preparação do canal radicular e no propósito de aumentar a acção de soluções irrigantes (Plotino *et al.*, 2007).

No que diz respeito às técnicas de irrigação ultra-sónica estão descritas duas técnicas – uma que está associada a instrumentação concomitante, ou seja é uma técnica de instrumentação ultra-sónica “UI” - e uma em que só se faz irrigação (não havendo qualquer instrumentação), denominada de instrumentação ultra-sónica passiva “PUI” (van der Sluis *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2009).

A técnica que conjuga instrumentação com irrigação – UI – apresenta resultados mais positivos, relativamente à limpeza do canal, comparativamente com aqueles que são obtidos quando se faz uma preparação e irrigação convencional (Gu *et al.*, 2009). Contudo, esta técnica apresenta, com alguma frequência, perfurações radiculares e preparações canulares irregulares, uma vez que é difícil controlar a quantidade de dentina que é cortada durante a preparação (Gu *et al.*, 2009). Perante estes resultados, a UI tem vindo a ser preterida em prol da PUI (Gu *et al.*, 2009).

A PUI foi pela primeira vez descrita por Weller (van der Sluis *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2009), no entanto, o termo passivo não descreve adequadamente o processo que ocorre durante a irrigação. Este termo está relacionado com a ausência de capacidade de corte da lima utilizada na irrigação, contrariamente à da lima utilizada na UI (van der Sluis *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2009; Zeltner *et al.*, 2009). De acordo com este facto, a PUI é descrita como uma técnica de irrigação em que não há qualquer instrumentação ou contacto nas paredes do canal por parte do dispositivo de irrigação (van der Sluis *et al.*, 2007; Tasdemir *et al.*, 2008; Gu *et al.*, 2009; Zeltner *et al.*, 2009).

Terminada a preparação do canal, é introduzida no centro do mesmo uma lima de diâmetro reduzido, de forma a não tocar em qualquer parede (van der Sluis *et al.*, 2007; Tasdemir *et al.*, 2008; Gu *et al.*, 2009). As limas utilizadas para este tipo de irrigação devem ser de reduzido diâmetro, 15 ou 20, para que o movimento seja o mais livre e passivo possível. Quando uma lima de tamanho 25 é utilizada, o movimento produzido é relativamente menor, uma vez que a lima só se move livremente na porção

mais larga do canal (van der Sluis *et al.*, 2007). Aquando da activação, a lima move-se livremente no interior do canal, originando vibração acústica que culmina na formação de um turbilhão no líquido irrigante que, desta forma, atinge mais facilmente todas as irregularidades do sistema canalar (van der Sluis *et al.*, 2007; Tasdemir *et al.*, 2008; Gu *et al.*, 2009).

Esta técnica tem demonstrado ser mais eficaz do que a irrigação manual no que diz respeito à eliminação de raspas de dentina, bactérias (planctónicas ou em biofilme) e tecido pulpar (van der Sluis *et al.*, 2007; Tasdemir *et al.*, 2008).

Dois fenómenos podem justificar o aumento de eficácia do irrigante quando este é agitado por ultra-sons. Para além da vibração acústica provocada pela activação ultra-sónica da lima, produz-se também um outro fenómeno denominado de cavitação. Assim, estes dois fenómenos actuam como possíveis promotores da acção dos irrigantes, nomeadamente do NaOCl (Plotino *et al.*, 2007; van der Sluis *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2009; van der Sluis *et al.*, 2010).

Como referido anteriormente, a vibração acústica consiste na criação de um rápido e intenso movimento circular da solução irrigante em torno de um dispositivo de irrigação que se encontra a vibrar (Anexo I, Figura 1) (Sabins *et al.*, 2003; Munley e Goodell, 2007; van der Sluis *et al.*, 2007). Pensa-se que, aquando da vibração acústica, são produzidas forças de cisalhamento contra as paredes do canal, mecanismo que facilita a remoção de depósitos, tanto minerais como bacterianos, do sistema canalar (van der Sluis *et al.*, 2007).

A intensidade da vibração acústica encontra-se directamente relacionada com a velocidade de vibração (van der Sluis *et al.*, 2007). A velocidade pode ser calculada de acordo com a seguinte equação (van der Sluis *et al.*, 2007):

$$v = \frac{\omega \varepsilon_0^2}{a},$$

em que v corresponde à velocidade da vibração da solução irrigante, ω corresponde a 2π da frequência de rotação, ε_0 consiste na amplitude do dispositivo e a consiste no raio do dispositivo (van der Sluis *et al.*, 2007).

Assim, e após a análise da equação acima descrita, é possível verificar que quanto mais fino o dispositivo, maior a frequência e maior a amplitude de movimento, maior será a velocidade de vibração e, conseqüentemente, maior será o efeito produzido pela vibração acústica (Munley e Goodell, 2007; van der Sluis *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2009).

A cavitação é o fenómeno que, em termos de mecânica de fluxo, pode ser descrito pela formação de pequenas bolhas originadas a partir de forças de tensão existentes num líquido a elevadas velocidades (van der Sluis *et al.*, 2007).

Assim, a cavitação consiste não só no processo de formação de novas bolhas, mas também na expansão, contracção/distorção de bolhas já pré-existentes num dado líquido, processo que está intimamente relacionado com a energia acústica (Anexo I, Figura 2) (van der Sluis *et al.*, 2007; van der Sluis *et al.*, 2010). No caso de soluções salinas, como é o caso do NaOCl, sabe-se que a coalescência de bolhas se encontra inibida, o que resulta num elevado número de bolhas recém-formadas (van der Sluis *et al.*, 2010).

A distorção ou expansão destas pode resultar no seu colapso, o que conduz à libertação de um fluxo de energia que tem a capacidade de conduzir à desagregação do biofilme bacteriano ou das raspas de dentina (van der Sluis *et al.*, 2007). Contudo, este fenómeno só é realmente eficaz quando a lima vibra livremente no interior do canal, ou quando ocorre um contacto leve e acidental nas paredes do mesmo (van der Sluis *et al.*, 2007).

Apesar do fenómeno de vibração acústica se encontrar bem descrito, evidenciado e relativamente consensual (Sabins *et al.*, 2003; Munley e Goodell, 2007; Plotino *et al.*, 2007; van der Sluis *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2009), o fenómeno de cavitação parece proporcionar menos benefícios ou, em alguns estudos, nem ocorrer (Walmsley 1987, Ahmad *et al.* 1988, LumLey *et al.* 1988, citado em van der Sluis *et al.*, 2007).

Na PUI, duas técnicas podem ser utilizadas para dispensar o irrigante no canal radicular, a de fluxo contínuo com unidades ultra-sónicas, ou a de fluxo intermitente com seringa manual (Gu *et al.*, 2009). Na técnica de fluxo intermitente, o irrigante é colocado no canal através de uma seringa, sendo recolocado após cada ciclo de activação ultra-sónica. Nesta técnica, é possível controlar a quantidade de irrigante ao nível da zona apical, dado que é conhecida quer a profundidade de penetração da seringa, quer o volume administrado, contrariamente à técnica de fluxo contínuo, conferindo-lhe assim uma vantagem adicional (Gu *et al.*, 2009).

Uma vez que ainda não está estabelecido na literatura qual o volume mais indicado a utilizar durante a irrigação final com activação ultra-sónica, este estudo propõe-se a estudar se existe ou não alguma diferença de eficácia bactericida de uma solução de NaOCl, quando são aplicados diferentes volumes.

HIPÓTESES

Hipótese Alternativa (H1)

A irrigação final com activação ultra-sónica de um volume de 5 mL de uma solução de NaOCl a 5,25% apresenta uma eficácia bactericida superior relativamente a um volume de 2,5 mL da mesma solução, em raízes de dentes infectados com *E. faecalis*.

Hipótese Nula (H0)

A irrigação final com activação ultra-sónica de um volume de 5 mL de uma solução de NaOCl a 5,25% apresenta uma eficácia bactericida igual ou inferior relativamente a um volume de 2,5 mL da mesma solução, em raízes de dentes infectados com *E. faecalis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparação da amostra

Para este estudo foram seleccionados 46 dentes unirradiculares, recolhidos em várias clínicas da região de Lisboa. Após a extracção, os dentes foram mantidos em água destilada. Posteriormente, a superfície externa dos mesmos foi limpa com ponta destartarizadora (Anexo I, Figura 1), sendo de seguida autoclavados (a 121° C durante 15 minutos), para evitar a proliferação bacteriana. Após a esterilização, cortou-se a coroa dos dentes, ao nível da junção amelo-cementária, com um disco de carbide, colocado numa peça de mão (Anexo II, Figura 2).

Para determinar o comprimento de trabalho, introduziu-se uma lima K 10 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça), até se ver a ponta da lima a sair do ápex (Anexo II, Figura 3). Seguidamente, recuou-se a mesma até ao ponto em que não fosse mais vista (Anexo II, Figura 4). Ajustou-se o respectivo *stop* ao topo da raíz, retirou-se a lima e registou-se o comprimento. O comprimento de trabalho foi estabelecido subtraindo um milímetro (mm) a esta medição.

Os dentes que não foram possíveis permeabilizar, os de comprimento menor que 12 mm e aqueles que apresentavam mais do que um canal por raíz, foram excluídos. Os dentes cujo comprimento de trabalho fosse superior a 12 mm foram novamente cortados até se obter este valor.

Preparação da amostra de dentes

Para iniciar a instrumentação dos dentes, foi criada uma via de permeabilidade com limas manuais K 10, 15 e 20 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça). De seguida, foi utilizado o sistema rotativo ProTaper Universal® (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça), seguindo a sequência recomendada pelo fabricante (S1,Sx,S1,S2,F1,F2,F3) usando o motor ATR® (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça).

Durante a instrumentação, os canais foram irrigados com 0,2 mL de NaOCl a 5,25%, entre cada instrumento, usando seringas e agulhas de 28 Gauge (G) de saída apical (BD Microlance 3, Becton Dickinson SA, Espanha).

Depois de terminada a instrumentação, procedeu-se à eliminação da *smear-layer*. Para tal, procedeu-se à irrigação com 1 mL de ácido cítrico a 10% durante 1

minuto, seguido de 1 mL de água destilada durante 30 segundos. Posteriormente secaram-se os canais com cones de papel de diâmetro 30.

Para cada grupo de dentes do estudo e do controlo fizeram-se corresponder, aleatoriamente, diferentes cores de verniz de unhas. Os dentes foram aleatoriamente distribuídos pelo grupo experimental e de controlo. Seguidamente selaram-se os ápices e toda a superfície radicular com duas camadas de verniz da cor seleccionada, num suporte feito para esse fim.

Os dentes foram acondicionados em embalagens individuais de esterilização e esterilizaram-se em autoclave a 121°C, durante 15 min.

Preparação da suspensão bacteriana de inculação

Todos os ensaios descritos foram realizados com *E. faecalis* ATCC 51299 crescida em meio Brain Heart Infusion (BHI) (Oxoid, Ltd Basingstoke Hampshire, Inglaterra).

Inicialmente as células de *E. faecalis* foram crescidas durante 24 horas a 37 °C num meio sólido selectivo para esta espécie (Slanetz & Bartley – Oxoid, Ltd Basingstoke Hampshire, Inglaterra) (Anexo II, Figura 5) e posteriormente foram inoculadas em BHI líquido e incubadas a 37 °C, durante 24 horas. O crescimento celular foi verificado espectrofotometricamente a 600 nm (Camspec M501) e a densidade óptica foi ajustada para 0,5 com BHI estéril uma vez que em estudos prévios (Mercade *et al.*, 2009) determinaram que correspondia a 2×10^9 unidades formadoras de colónias (UFC)/mL. Para evitar contaminação das culturas de *E. faecalis*, todos os procedimentos de manuseamento das culturas foram realizados à chama.

Inoculação da suspensão bacteriana

Foram colocados 30 µL (microlitros) de água destilada esterilizada no fundo de 46 microtubos colocando-se, logo de seguida, os dentes nos mesmos.

Cada canal radicular foi inoculado com 10 µL da suspensão de *E. faecalis* preparada anteriormente, utilizando micropipetas estéreis, à excepção do controlo negativo, que foi inoculado com BHI estéril. Ambos os procedimentos foram efectuados com micropipeta. Incubaram-se os tubos a 37°C, durante 48 h, em atmosfera húmida confinada, para permitir o crescimento bacteriano.

Procedimentos de desinfecção experimental

Depois da incubação, os dentes foram irrigados, segundo o protocolo de irrigação estabelecido para cada grupo. Todos os procedimentos foram efectuados em condições e com procedimentos assépticos, em câmara de fluxo laminar.

GRUPO 1: Irrigação e activação ultra-sónica de 2,5 mL de NaOCl a 5,25%

20 dentes previamente inoculados com *E. faecalis* foram irrigados com 2,5 mL de NaOCl a 5,25%, tendo o irrigante sido activado com ponta de diâmetro 20 (ProUltra® PiezoFlow™ Ultrasonic Irrigation) colocado na unidade piezo-elétrica (Spartan, USA), com o valor 2 de intensidade da unidade, actuando durante 1 min. Seguidamente, inactivou-se o NaOCl irrigando com 1 mL de tiosulfato de sódio a 5% deixando-se actuar durante 1 min.

GRUPO 2: Irrigação e activação ultra-sónica de 5 mL de NaOCl a 5,25%

20 dentes previamente inoculados com *E. faecalis* foram irrigados com 5 mL de NaOCl a 5,25%, tendo o irrigante sido activado com ponta de diâmetro 20 (ProUltra® PiezoFlow™ Ultrasonic Irrigation) colocado na unidade piezo-elétrica (Spartan, USA), com o valor 2 de intensidade da unidade, actuando durante 1 min. Seguidamente, inactivou-se o NaOCl irrigando com 1 mL de tiosulfato de sódio a 5% deixando-se actuar durante 1 min.

GRUPO 3. Controlo Negativo

Irigaram-se 3 dentes, que previamente tinham recebido 10 µL de BHI estéril no interior do canal, com 1 mL de tiosulfato de sódio a 5% e deixou-se actuar durante 1 min.

GRUPO 4. Controlo Positivo

Irigaram-se 3 dentes previamente inoculados com *E. faecalis* com 1 mL de tiosulfato de sódio 5% e deixou-se actuar durante 1 min.

Em todos os procedimentos de irrigação, Os dentes foram irrigados com seringa convencional e agulha esterilizada, 28G com saída apical (BD Microlance 3, Becton Dickinson SA, Espanha).

Análise da desinfecção experimental

Logo após os procedimentos de irrigação, foi introduzido um cone de papel esterilizado F3 no canal, procedimento feito em triplicado. Este cone foi, de seguida, introduzido num tubo de ensaio que continha 5 mL de BHI estéril.

Os tubos contendo os cones foram colocados em estufa, a 37°C, durante 72 h, para se avaliar um eventual crescimento bacteriano, dado pela turvação do meio. De forma a permitir uma difusão do oxigénio, nutrientes e metabolitos centrifugou-se a cada 24 h cada tubo.

RESULTADOS

O não crescimento bacteriano indica-nos os dentes livres de bactérias ou que foram desinfetados.

Todos os grupos de controlo negativo encontravam-se com crescimento bacteriano. Foram repetidos os ensaios por forma a obtermos resultados válidos, registando-se neste segundo ensaio o mesmo problema.

Assim, os dados recolhidos do procedimento experimental, não podem ser validados.

Apesar disso, são apresentados os dados obtidos após o primeiro ensaio.

Grupos	Crescimento	Sem crescimento
Grupo 1 (2,5 mL NaOCl a 5,25%)	47 (tubos)	13 (tubos)
Grupo 2 (5 mL NaOCl a 5,25%)	43 (tubos)	17 (tubos)
Controlo positivo	9 (tubos)	0 (tubos)
Controlo negativo	9 (tubos)	0 (tubos)

Tabela I – Resultados obtidos, em número de tubos, após o protocolo de desinfecção.

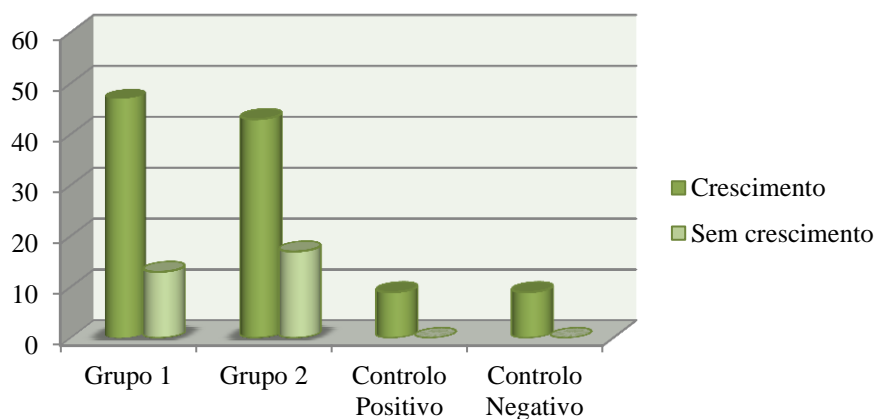


Gráfico I – Resultados da desinfecção nos grupos de trabalho.

Uma vez que os resultados não são válidos, não serão analisados.

DISCUSSÃO

Após a completa preparação mecânica dos canais radiculares durante o tratamento endodôntico, algumas áreas de difícil acesso permanecem sem qualquer tipo de instrumentação, podendo funcionar como depósitos de detritos orgânicos e inorgânicos que, posteriormente, podem conduzir à re-infecção endodôntica (Jiang *et al.*, 2010; Retamozo *et al.*, 2010). Torna-se então imprescindível a acção de agentes irrigantes, pois estes conseguem aceder às zonas de difícil acesso aos instrumentos mecânicos (Gu *et al.*, 2009).

Os canais radiculares após a preparação mecânica encontram-se mais largos, o que vai facilitar a chegada dos irrigantes a toda a zona em torno das paredes do canal, tornando assim a lavagem final num passo essencial após a preparação químico-mecânica do canal (Jiang *et al.*, 2010).

Apesar de alguns estudos defenderem que quanto maior a preparação do canal, melhor a remoção de detritos orgânicos e inorgânicos (Ram, 1977; Falk e Sedgley, 2005), outros defendem que uma maior preparação canalar pode originar um enfraquecimento das paredes radiculares, piorando o prognóstico do dente em causa (Druttman e Stock, 1989; Falk e Sedgley, 2005). Contrariamente a estas evidências, Chow *et al.* (1983) afirma que os canais podem ser alargados em apical, no mínimo até um diâmetro de 20, ao passo que Abou-Rass *et al.* (1982), defende que 25 é o diâmetro mínimo de preparação.

Assim, é necessário encontrar um equilíbrio entre a máxima eficácia de irrigação, sem que haja qualquer comprometimento da estrutura radicular remanescente (Falk e Sedgley, 2005). Avaliando estes factores e tendo em conta outros estudos previamente executados (Abou-Rass e Piccinino, 1982; Chow, 1983; Torabinejad, 2003; Miller e Baumgartner, 2010), no nosso estudo todos os dentes foram instrumentados até um diâmetro 30 em apical. De referir que muitos destes estudos correspondem a preparações com instrumentos de conicidade a 2%. Como o sistema utilizado foi o ProTaper Universal® e o último instrumento utilizado foi a lima F3 que apresenta um diâmetro 0,30 mm na ponta e uma conicidade de 9% nos 5 mm terminais, poderá mesmo não ser necessário alargar o canal em apical a diâmetros superiores a 0,30 mm, dado que o aumento da conicidade na preparação, facilita a chegada da agulha (e consequentemente do irrigante) ao ápex (Boutsioukis C *et al.*, 2010).

Para este estudo foram recolhidos dentes unirradiculares para tentar minimizar as variabilidades anatómicas dentro da amostra, tal como em diversos estudos anteriores (Mercade *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2010; van der Sluis *et al.*, 2010).

Todos os dentes foram preparados e posteriormente pintados com duas camadas de verniz de unhas, para selar tanto o ápex como eventuais canais laterais e túbulos dentinários (em áreas desprovidas de cimento), criando um ambiente mais controlado para a inoculação de bactérias, para além de mimetizar a realidade clínica, através de vários factores, como o *vapor-lock* (Caron *et al.*, 2010; de Gregorio *et al.*, 2010).

Tanto as bactérias como os seus sub-produtos são considerados o agente causal primário em situações de necrose pulpar e infecções periapicais (Hancock *et al.*, 2001). Do mesmo modo, tratamentos endodônticos que fracassam têm como principal causa microrganismos que persistem após o tratamento, ou que infectam novamente o sistema canalar através de uma selagem coronal desadequada (Molander *et al.*, 1998; Hancock *et al.*, 2001).

O microrganismo utilizado no nosso estudo foi o *E. faecalis* que, apesar de ser ocasionalmente isolado em casos de infecção endodôntica primária (4 a 40%), é isolado entre 23 a 70% dos casos de retratamentos (Kayaoglu e Ørstavik, 2004; Stuart *et al.*, 2006) (Hancock *et al.*, 2001; Nair, 2006; Chávez de Paz, 2007). O *E. faecalis* consegue viver em mono-infecção ou em biofilme, sobrevive a períodos de privação de alimentos e é relativamente fácil de crescer em laboratório (Nair, 2006; Mercade *et al.*, 2009).

Esta bactéria consegue viver em ambientes muito hostis, no que diz respeito a temperaturas, pH e salinidade da solução utilizada para o eliminar, o que o torna uma bactéria extremamente resistente (Kayaoglu e Ørstavik, 2004; Nair, 2006; Stuart *et al.*, 2006).

Ao longo dos anos, vários estudos têm sido realizados para determinar o agente irrigante ideal para a eliminação, tanto de bactérias, como de detritos inorgânicos.

Este agente irrigante ideal deveria apresentar as seguintes características: largo espectro de acção antimicrobiano e eficácia contra bactérias anaeróbias facultativas, bem como contra bactérias organizadas em biofilme; dissolução de tecido pulpar; inactivação de endotoxinas; prevenção de formação de *smear layer* durante a instrumentação ou dissolução da mesma, caso fosse produzida (Zehnder, 2006; Haapasalo *et al.*, 2010). Quando em contacto com os tecidos vitais, não deveria ser tóxico, nem irritante e deveria ter pouca capacidade de causar reacções alérgicas (Zehnder, 2006; Haapasalo *et al.*, 2010).

O NaOCl é o irrigante mais estudado e utilizado na prática de endodontia, devido à sua eficácia bactericida, eficácia na eliminação de tecido pulpar e acção lubrificante (Borin *et al.*, 2007; Mercade *et al.*, 2009), daí que tenha sido o irrigante utilizado no nosso estudo. A concentração utilizada foi de 5,25% pois segundo Vianna *et al.* (2004), esta concentração destrói os microrganismos existentes em poucos segundos. Porém, há que ter em conta a elevada citotoxicidade da solução, nestas concentrações (Siqueira *et al.*, 2000). Para que não houvesse um prolongamento do tempo de actuação do NaOCl, nem a transferência do mesmo aquando da colheita de amostras bacteriológicas para cultura (que iria resultar em muitos resultados falsos negativos, uma vez que os meios de cultura são muito sensíveis a resíduos de agentes antimicrobianos), foi utilizado um neutralizador do mesmo, o tiosulfato de sódio a 5%, como descrito por Radcliff *et al.* (2004).

Uma vez que o NaOCl não tem capacidade de remover a *smear layer*, este deve ser combinado com agentes quelantes (Yamada *et al.*, 1983).

A *smear-layer* consiste numa camada de tecido orgânico e inorgânico – fragmentos de processos odontoblásticos, tecido necrótico e microrganismos – e é produzida durante a instrumentação, especialmente em casos de instrumentação rotatória (Scelza *et al.*, 2002; Torabinejad, 2003; Machado-Silveiro *et al.*, 2004). Esta camada, quando não é eliminada de uma forma eficaz, oclui os túbulos dentinários e pode funcionar como um reservatório de agentes irritantes (Scelza *et al.*, 2002), impedido o contacto directo de medicamentos canulares com os microrganismos e o íntimo contacto do material obturador com a parede radicular (Lee *et al.*, 2004).

É então essencial a remoção da *smear layer* (Yamada *et al.*, 1983; Scelza *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004). Para tal, é necessária uma acção conjunta do NaOCl (que remove a porção orgânica) e agentes quelantes (que removem a porção inorgânica). No entanto, nenhuma destas substâncias usada individualmente é capaz de remover estes dois elementos na sua totalidade (Yamada *et al.*, 1983).

Existem várias substâncias capazes de remover a *smear layer*, contudo, as mais utilizadas são o EDTA e o ácido cítrico (Yamada *et al.*, 1983; Yamaguchi *et al.*, 1996; Zehnder, 2006). Estas substâncias são agentes quelantes que alteram a proporção dos iões cálcio e fosfato da superfície dentinária, alterando assim a sua estrutura (Scelza *et al.*, 2003; Machado-Silveiro *et al.*, 2004)

O ácido cítrico é um agente quelante com capacidade bactericida contra microrganismos anaeróbios e com capacidade de dissolução da dentina (Yamaguchi *et*

al., 1996) podendo ser utilizado em concentrações que variam entre o 1% e os 50% (Haapasalo *et al.*, 2010). Tal como no estudo de Machado-Silveiro *et al.* (2004) foi utilizado o ácido cítrico porque apresenta bons resultados de desmineralização e a concentração escolhida foi de 10%, dado que a esta concentração o pH da solução está perto da neutralidade, o que o torna mais biocompatível e mais eficaz no processo de descalcificação de dentina (Machado-Silveiro *et al.*, 2004).

Neste estudo foi utilizada como técnica de irrigação, a irrigação ultra-sónica passiva – PUI.

Esta técnica tem apresentado, nos últimos anos, resultados mais eficazes na remoção de detritos orgânicos e inorgânicos relativamente à técnica de irrigação manual (Druttman e Stock, 1989; Lee *et al.*, 2004; van der Sluis *et al.*, 2007; Haapasalo *et al.*, 2010). Tal facto pode ser devido a dois fenómenos que ocorrem durante esta técnica – vibração acústica e cavitação (Druttman e Stock, 1989; Lee *et al.*, 2004; Plotino *et al.*, 2007; van der Sluis *et al.*, 2010).

Durante a técnica de irrigação foi utilizada uma lima de calibre 20, pois segundo alguns autores (van der Sluis *et al.*, 2007; Tasdemir *et al.*, 2008; Gu *et al.*, 2009) quanto menor for o calibre do dispositivo utilizado, maior será o seu movimento no interior do canal e, conseqüentemente, o seu efeito. Como Gu *et al.* (2009) demonstraram na sua revisão que a colocação intermitente de irrigante no canal apresentava resultados mais significativos relativamente à desinfecção canalar, este foi o procedimento utilizado no nosso estudo.

A eficácia das soluções irrigantes pode ser aumentada pela agitação do mesmo (é o que se passa na PUI) ou, eventualmente, pelo aumento do volume (Kahn *et al.*, 1995; Nadalin *et al.*, 2009).

O volume ideal ou que se deve utilizar é uma variável um pouco controversa.

Se por um lado existem estudos que afirmam que um aumento de volume não implica necessariamente um aumento de eficácia de remoção de detritos (Lee *et al.*, 2004; van der Sluis *et al.*, 2006), outros defendem que o aumento do volume produz melhores resultados comparativamente com volumes mais reduzidos (Baker *et al.*, 1975; Thé, 1979; Chow, 1983; Sedgley *et al.*, 2004; Berber *et al.*, 2006).

Baker *et al.* (1975) afirmou que grandes volumes são mais eficazes na remoção de detritos do que volumes reduzidos, sendo o factor chave para este facto a acção mecânica do irrigante e não a capacidade de dissolução do mesmo.

Em 1979, Thé demonstrou que, para o mesmo tempo de exposição, a quantidade de tecido conjuntivo necrótico que permanecia após a irrigação era tanto menor, quanto maior era o volume (volumes de 5 mL, após 30 min, deixavam apenas 5% de tecido necrótico).

Estudos mais recentes de bioluminescência bacteriana, mostram que perante volumes de 6 mL permanecem no canal cerca de 8,03% das bactérias previamente inoculadas, enquanto que para volumes de 3 mL permanecem cerca de 9,17% (Sedgley *et al.*, 2004).

Perante estes dados controversos, resolveu-se avaliar então se um aumento de volume propiciava um aumento da actividade bactericida da solução de NaOCl.

Com o objectivo de avaliar estes dados, foram colhidas amostras para cultura microbiológica após o protocolo de desinfecção canalar, através da utilização de cones de papel esterilizados, procedimento previamente executado em estudos anteriores (Berber *et al.*, 2006; Mercade *et al.*, 2009). A vantagem deste procedimento é que pode ser utilizado tanto em estudos *in vitro*, como *in vivo* (Mercade *et al.*, 2009). Contudo, pode ser considerado um método limitado e subestimado, pois apenas as bactérias existentes no canal principal podem ser recolhidas e cultivadas, não avaliando os microrganismos que permanecem nos túbulos dentinários (Mercade *et al.*, 2009; Miller e Baumgartner, 2010).

Os resultados foram avaliados após as 72 h, como preconizado por Mercade *et al.* (2009).

O grupo de controlo positivo efectuado teve como objectivo garantir que as bactérias inoculadas se encontravam viáveis em todos os procedimentos experimentais, e que a solução inactivadora (do NaOCl) tiosulfato de sódio a 5%, não tinha por si efeito bactericida. O grupo de controlo negativo efectuado, ao não se inocular com bactérias os seus dentes, teve como objectivo garantir a esterilidade dos procedimentos.

Às 72 h todos os tubos referentes ao controlo negativo encontravam-se com turvação, ou seja, com crescimento bacteriano. Como este facto não era compatível com a validação do nosso estudo, o protocolo foi novamente repetido, fazendo-se um segundo ensaio, com o objectivo de obter controlos positivos com turvação e controlos negativos sem qualquer indício de proliferação bacteriana, por forma a validar correctamente o nosso trabalho experimental.

Contudo, a mesma situação ocorreu aquando da repetição. Nesta fase, não só os controlos estavam todos positivos, como praticamente os grupos experimentais também

o estavam (Anexo III, Figura 1). Não só estes tubos, mas o próprio meio de BHI que estava estéril no dia do protocolo de desinfecção, encontrava-se turvo. Para além do precipitado que é comum formar quando estamos perante uma amostra com *E. faecalis*, formaram também depósitos à superfície do meio, o que é indicador que não estamos perante uma contaminação única e exclusivamente com *E. faecalis*, mas sim perante uma contaminação com qualquer outro microrganismo (Anexo III, Figura 1).

Uma vez que todo o material se encontrava devidamente esterilizado, que o trabalho foi realizado cuidadosamente com todos os procedimentos assépticos e o único denominador comum na repetição do procedimento foi a câmara de fluxo laminar, a possível causa que encontramos para esta contaminação é o facto desta não estar a funcionar nas devidas condições de assépsia. Será uma hipótese, a câmara de fluxo laminar ter tido algum distúrbio no final dos procedimentos do primeiro ensaio, pois os grupos de controlo foram os últimos a processar em termos de protocolo de irrigação. Tal pode justificar que nos grupos experimentais não tivéssemos a situação de todos os tubos apresentarem crescimento, e para além disso, termos resultados consistentes com o que alguns autores apresentam: maiores volumes conduzem a uma maior desinfecção. Esta hipótese também poderá explicar porque no segundo ensaio, praticamente todos os tubos estavam com crescimento bacteriano e contaminações suplementares.

Dada a dificuldade quer em termos de tempo, quer em termos de recursos para executar todo o protocolo pela terceira vez, não são possíveis apresentar dados válidos do nosso estudo.

Porém, na primeira execução do protocolo experimental, apesar de não ser possível validar os resultados, no Grupo 1, apenas 13 tubos não tiveram crescimento, o que corresponde a cerca de 21,67%, enquanto que no Grupo 2, foram 17 os tubos que não tiveram crescimento (28,3%). Mais uma vez, como não é possível validar o estudo, estes resultados podem não mostrar realmente o efeito do volume numa solução de NaOCl.

Para além de ser importante efectuar um terceiro ensaio, com o mesmo protocolo e de modo que ocorra sem quaisquer problemas mais estudos serão necessários para que se possa aferir se o aumento do volume influencia, ou não a eficácia bactericida dos irrigantes.

CONCLUSÃO

Sem a existência de controlos que atestem se um estudo é passível de ser validado ou não, os dados obtidos não podem ser considerados, nem analisados estatisticamente.

Tendo em conta as condições do nosso estudo, não é possível aferir se as hipóteses previamente formuladas estão ou não rejeitadas. Para tal, é necessário que se execute todo o protocolo experimental num local em que esteja garantida a assépsia, para que se possa aferir se o aumento do volume aumenta, ou não a eficácia bactericida de uma solução de NaOCl, segundo as condições do estudo.

BIBLIOGRAFIA

1. Abou-Rass M, Piccinino MV. The effectiveness of four clinical irrigation methods on the removal of root canal debris. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1982;54(3):323-8.
2. Baker NA, Eleazer PD, Averbach RE, Seltzer S. Scanning electron microscopic study of the efficacy of various irrigating solutions. *J Endod.* 1975;1(4):127-35.
3. Berber VB, Gomes BP, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *Int Endod J.* 2006;39(1):10-7.
4. Borin G, Becker AN, Oliveira EP de. A história do hipoclorito de sódio e a sua importância como substância auxiliar no preparo químico mecânico de canais radiculares. *Revista de Endodontia Pesquisa e Ensino On Line.* 2007;5:1-5.
5. Boutsoukis C, Gogos C, Verhaagen B, Versluis M, Kastrinakis E, Van der Sluis LW. The effect of root canal taper on the irrigant flow: evaluation using an unsteady Computational Fluid Dynamics model. *Int Endod J.* 2010;43(10):909-16.
6. Caron G, Nham K, Bronnec F, Machtou P. Effectiveness of Different Final Irrigant Activation Protocols on Smear Layer Removal in Curved Canals. *J Endod.* 2010;36(8):1361-6.
7. Chávez de Paz L. Redefining the Persistent Infection in Root Canals: Possible Role of Biofilm Communities. *J Endod.* 2007;33(6):652-62.
8. Chow TW. Mechanical Effectiveness of Root Canal Irrigation. *J Endod.* 1983;9(11):475-9.
9. de Gregorio C, Estevez R, Cisneros R, Heilborn C, Cohenca N. Effect of EDTA, Sonic, and Ultrasonic Activation on the Penetration of Sodium Hypochlorite into Simulated Lateral Canals: An In Vitro Study. *J Endod.* 2009;35(6):891-895.
10. de Gregorio C, Estevez R, Cisneros R, Paranjpe A, Cohenca N. Efficacy of Different Irrigation and Activation Systems on the Penetration of Sodium Hypochlorite into Simulated Lateral Canals and up to Working Length: An *In Vitro* Study. *J Endod.* 2010;36(7):1216-21.
11. Druttman AC, Stock CJ. An *in vitro* comparison of ultrasonic and conventional methods of irrigant replacement. *Int Endod J.* 1989;22(4):174-8.

12. Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spanó JC, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J.* 2002;13(2):113-7.
13. Falk KW, Sedgley CM. The Influence of Preparation Size on the Mechanical Efficacy of Root Canal Irrigation In Vitro. *J Endod.* 2005;31(10):742-5.
14. Giardino L, Savoldi E, Ambu E, Rimondini R, Palezona A, Debbia EA. Antimicrobial effect of MTAD, Tetraclean, Cloreximid, and sodium hypochlorite on three common endodontic pathogens. *Indian Journal of Dental Research.* 2009;20(3):391-398.
15. Gu LS, Kim JR, Ling J, Choi KK, Pashley DH, Tay FR. Review of contemporary irrigant agitation techniques and devices. *J Endod.* 2009;35(6):791-804.
16. Gutarts R, Nusstein J, Reader AL, Beck M. In Vivo Debridement Efficacy of Ultrasonic Irrigation Following Hand-Rotary Instrumentation in Human Mandibular Molars. *J Endod.* 2005;31(3):166-170.
17. Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in Endodontics. *Dent Clin North Am.* 2010;54(2):291-312.
18. Hancock HH 3rd, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;91(5):579-86.
19. Jiang LM, Verhaagen B, Versluis M, Zangrillo C, Cuckovic D, van der Sluis LWM. An Evaluation of the Effect of Pulsed Ultrasound on the Cleaning Efficacy of Passive Ultrasonic Irrigation. *J Endod.* 2010;36(11):1887-91.
20. Kahn FH, Rosenberg PA, Gliksberg J. An In Vitro Evaluation of the Irrigating Characteristics of Ultrasonic and Subsonic Handpieces and Irrigating Needles and Probes. *J Endod.* 1995;21(5):277-280.
21. Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence Factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship to Endodontic Disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15(5):308-320.
22. Lee SJ, Wu MK, Wesselink PR. The effectiveness of syringe irrigation and ultrasonics to remove debris from simulated irregularities within prepared root canal walls. *Int Endod J.* 2004;37(10):672-8.
23. Machado-Silveiro LF, González-López S, González-Rodríguez MP. Decalcification of root canal dentine by citric acid, EDTA and sodium citrate. *Int Endod J.* 2004;37(6):365-9.

24. Mercade M, Duran-Sindreu F, Kuttler S, Roig M, Durany N. Antimicrobial efficacy of 4.2% sodium hypochlorite adjusted to pH 12, 7.5, and 6.5 in infected human root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;107(2):295-8.
25. Miller TA, Baumgartner JC. Comparison of the Antimicrobial Efficacy of Irrigation Using the EndoVac to Endodontic Needle Delivery. *J Endod.* 2010;36(3):509-511.
26. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1998;31:1-7.
27. Munley PJ, Goodell GG. Comparison of Passive Ultrasonic Debridement Between Fluted and Nonfluted Instruments in Root Canals. *J Endod.* 2007;33(5):578-580.
28. Nadalin MR, Perez DE, Vansan LP, Paschoalato C, Sousa-Neto MD, Saquy PC. Effectiveness of Different Final Irrigation Protocols in Removing Debris in Flattened Root Canals. *Braz Dent J.* 2009;20(3):211-4.
29. Nair PN. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J.* 2006;39(4):249-81.
30. Plotino G, Pameijer CH, Grande NM, Somma F. Ultrasonics in Endodontics: A Review of the Literature. *J Endod.* 2007;33(2):81-95.
31. Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R, Hababbeh N, Qualtrough A, Worthington H, Drucker DB. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 2004;37(7):438-46.
32. Ram Z. Effectiveness of root canal irrigation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1977;44(2):306-12.
33. Retamozo B, Shabahang S, Johnson N, Apécio RM, Torabinejad M. Minimum Contact Time and Concentration of Sodium Hypochlorite Required to Eliminate *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2010;36(3):520-3.
34. Sabins RA, Johnson JD, Hellstein JW. A comparison of the Cleaning Efficacy of Short-Term Sonic and Ultrasonic Passive Irrigation after Hand Instrumentation in Molar Root Canals. *J Endod.* 2003;29(10):674-8.
35. Scelza MFZ, Teixeira AM, Scelza P. Decalcifying effect of EDTA-T, 10% (m/v) citric acid, and 17% EDTA on root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;95(2):234-6.

36. Sedgley C, Applegate B, Nagel A, Hall D. Real-Time Imaging and Quantification of Bioluminescent Bacteria in Root Canals In Vitro. J Endod. 2004;30(2):893-8.
37. Siqueira JF, Machado AG, Silveria RM, Lopes HP, de Uzeda M. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal, *in vitro*. Int Endod J. 1997;30:279-282.
38. Siqueira JF, Rôças IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical Reduction of the Bacterial Population in the Root Canal after Instrumentation and Irrigation with 1%, 2.5% (m/v), and 5.25% (m/v) Sodium Hypochlorite. J Endod. 2000;26(6):331-4.
39. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment. J Endod. 2006;32(2):93-8.
40. Tasdemir T, Er K, Celik D, Yildirim T. Effect of Passive Ultrasonic Irrigation on Apical Extrusion of Irrigating Solution. European Journal of Dentistry. 2008;2:198-203.
41. Thé SD. The solvent action of sodium hypochlorite on fixed and unfixed necrotic tissue. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1979;47(6):558-61.
42. Torabinejad M, Khademi AA, Babagoli J, Cho Y, Johnson WB, Bozhilov K, Kim J, Shabahang S. A New Solution for the Removal of the Smear Layer. J Endod. 2003;29(3):170-5.
43. Valera MC, Silva KC, Maekawa LE, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Camargo CH, *et al*. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite associated with intracanal medication for *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* inoculated in root canals. J Appl Oral Sci. 2009;17(6):555-9.
44. van der Sluis LW, Gambarini G, Wu MK, Wesselink PR. The influence of volume, type of irrigant and flushing method on removing artificially placed dentine debris from the apical root canal during passive ultrasonic irrigation. Int Endod J. 2006;39(6):472-6.
45. van der Sluis LW, Versluis M, Wu MK, Wesselink PR. Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. Int Endod J. 2007;40:415-26.
46. van der Sluis LW, Vogels MP, Verhaagen B, Macedo R, Wesselink PR. Study on the Influence of Refreshment/Activation Cycles and Irrigants on Mechanical

Cleaning Efficiency During Ultrasonic Activation of the Irrigant. J Endod. 2010;36(4):737-740.

47. Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004;97(1):79-84.

48. Yamada RS, Armas A, Goldman M, Lin PS. A Scanning Electron Microscopic Comparison of a High Volume Final Flush with Several Irrigating Solutions: Part 3. J Endod. 1983;9(4):137-42.

49. Yamaguchi M, Yoshida K, Suzuki R, Nakamura H. Root Canal Irrigation with Citric Acid Solution. J Endod. 1996;22(1):27-9.

50. Zehnder M. Root canal irrigants. J Endod. 2006;32(5):389-98.

51. Zeltner M, Peters OA, Paqué F. Temperature Changes During Ultrasonic Irrigation with Different Inserts and Modes of Activation. J Endod. 2009;35(4):573-7.

ANEXOS

ANEXO I – Vibração Acústica e Cavitação

Figura 1 - Vibração acústica em torno de uma lima em água e numa vista esquemática.

Figura 2 - Fenómeno de cavitação produzido por uma lima ao início da activação e a alta rotação.

ANEXO II – Preparação da Amostra e Suspensão Bacteriana

Figura 1 – Destartarização da superfície radicular.

Figura 2 – Corte da coroa ao nível da junção amelo-cementária.

Figura 3 – Determinação do comprimento endodôntico.

Figura 4 – Determinação do comprimento endodôntico.

Figura 5 – Unidades formadoras de colónias de *E. faecalis*, no meio Slanetz-Bartley

ANEXO III - Resultados

Figura 1 - Aspecto dos diferentes tubos obtidos no estudo, após 72h de incubação.

ANEXO I – Vibração Acústica e Cavitação

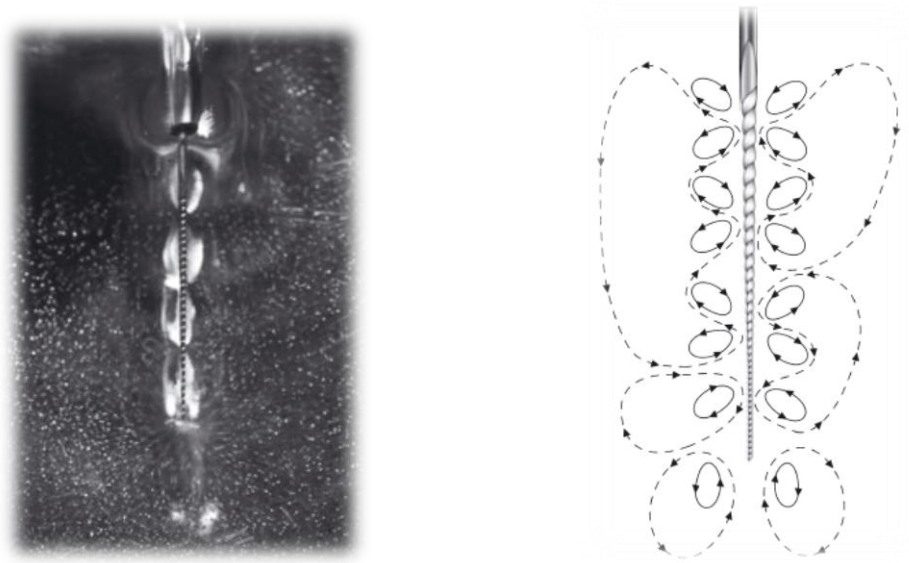


Figura 1 – Vibração acústica em torno de uma lima em água (esquerda) e numa vista esquemática (direita). Imagens reproduzidas de van der Sluis *et al.*, 2007.



Figura 2 – Fenómeno de cavitação produzido por uma lima ao início da activação (esquerda) e a alta rotação (direita). Imagens reproduzidas de van der Sluis *et al.*, 2007.

ANEXO II – Preparação da Amostra e Suspensão Bacteriana



Figura 1 – Destartarização da superfície radicular.



Figura 2 – Corte da coroa ao nível da junção amelo-cementária.



Figura 3 – Determinação do comprimento endodôntico.
(Lima a ultrapassar o ápex)

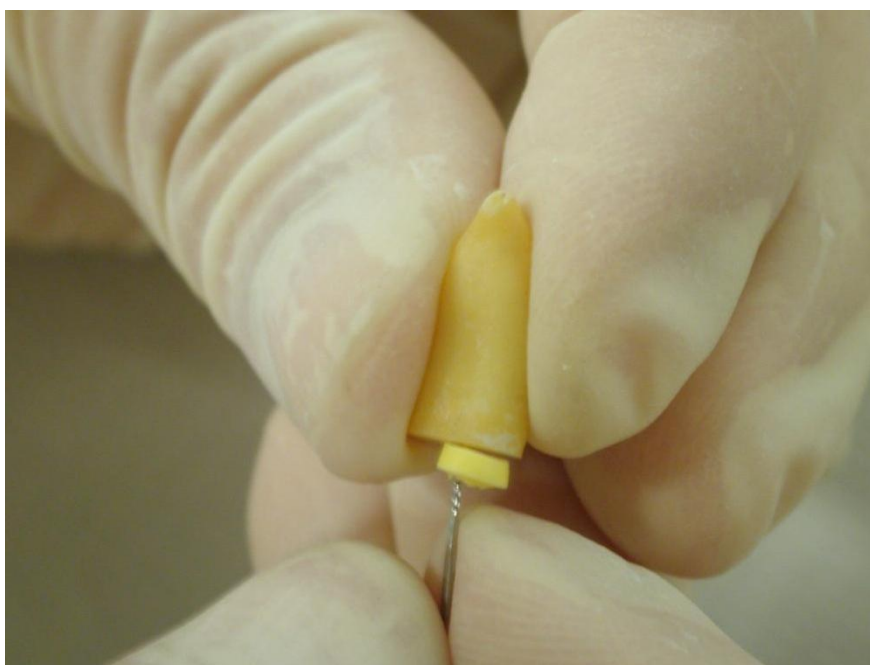


Figura 4 – Determinação do comprimento endodôntico.
(Lima já não é observável a partir do ápex)

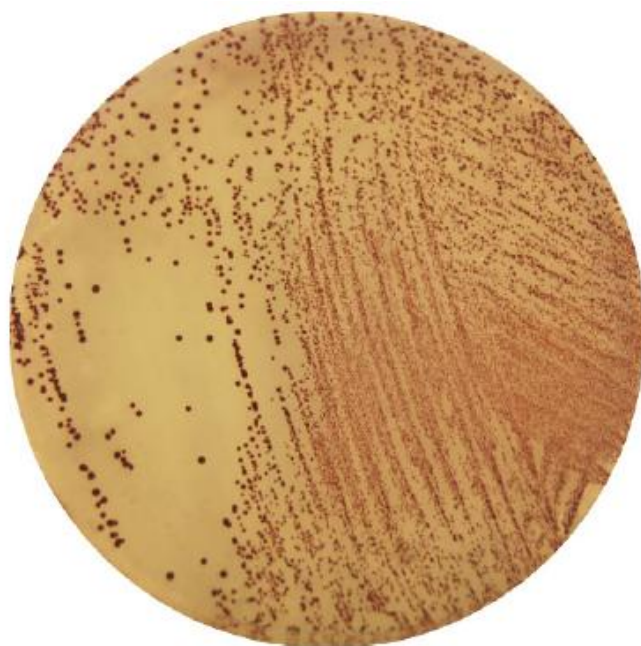


Figura 5 – Unidades formadoras de colónias de *E. faecalis*, no meio Slanetz-Bartley.

ANEXOS III – Resultados

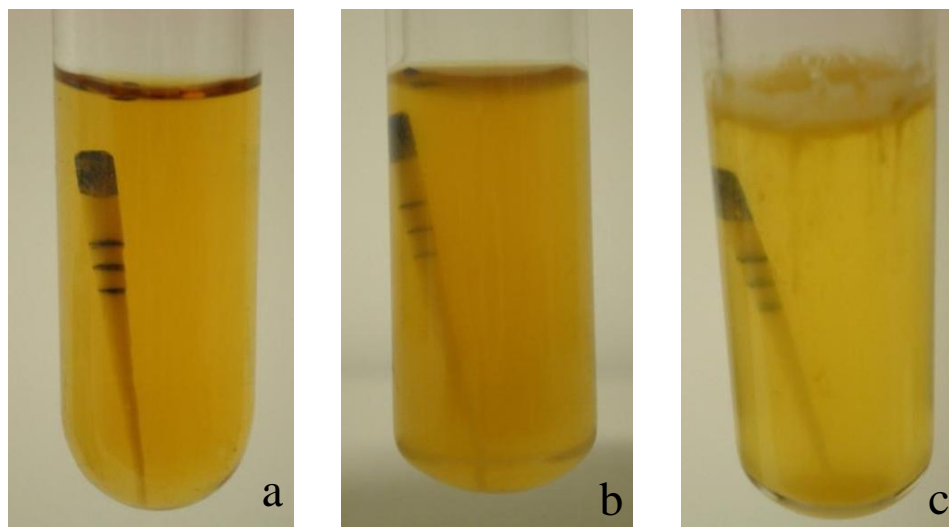


Figura 1 – Aspecto dos diferentes tubos obtidos no estudo, após 72h de incubação: a) tubo sem crescimento; b) tubo com turvação característica da *E faecalis*; c) tubo com turvação com características desconhecidas.